

HOT TOPICS

IN UROLOGIA



Studio Farmacocinetico per determinare la modalità di somministrazione più idonea per la gemcitabina endovesicale

Paolo Gontero¹, Luigi Cattel², Tonia C. Paone², Giovanna Berta¹, Chiara Fiorito¹, Paola Milla², Francesco Carbone², Claudio Medana², Alessandro Tizzani¹

¹*Urologia 1, Università degli Studi di Torino*

²*Dipartimento di Farmacologia, Università degli Studi di Torino*

Finanziamenti: Regione Piemonte anno 2006

Publicato su J Urol Volume 179, Issue 4, Supplement, Pages 1-816 (April 2008).

Riassunto:

Obiettivo: Valutare con uno studio farmacocinetico se sia possibile stabilire pH, concentrazione e durata dell'instillazione ottimali di gemcitabina (dFdC) in grado di favorire la migliore penetrazione tissutale del farmaco senza alterare significativamente l'assorbimento sistemico.

Metodi: Sei bracci di 3 pazienti ciascuno sono stati previsti per valutare la farmacocinetica intratumorale di 2000 mg di dFdC somministrata prima della TUR in una serie di carcinomi vescicali non muscolo invasivi (NMIBC). Il pH è stato valutato nei bracci 1 (pH 3.5) e 3 (pH 5.5) con 50 ml di dFdC per 1 ora in vescica, nei bracci 2 (pH 3.5) e 4 (pH 5.5) con 100 ml di dFdC per 1 ora e nei bracci 5 (pH 3.5) e 6 (pH 5.5) con 100 ml di dFdC per 2 ore. Il volume è stato valutato confrontando 50 ml vs 100 ml nei bracci 1 vs 2 e 3 vs 4 ed il tempo di instillazione (1 ora vs 2 ore) confrontando i bracci 2 vs 5 e 4 vs 6. Campioni di sangue ed urina sono stati ottenuti a diversi intervalli di tempo dall'instillazione. Biopsie a freddo della porzione vegetante, della base d'impianto e della mucosa macroscopicamente sana sono state analizzate con la metodica HPLC-MS per la determinazione del profilo farmacocinetico di dFdC e di dFdU (metabolica inattivo).

Risultati: Il braccio 3 è stato eliminato poichè a tale pH dFdC risulta essere insolubile. La Cmax plasmatica di dFdC (1,42 µM) è stata osservata nel braccio 5. La concentrazione intratumorale di dFdC a pH 5.5 è risultata essere 6 volte superiore nel braccio 2 vs 4 e 2 volte superiore nel braccio 5 vs 6 rispetto al pH 3.5 con aumenti simili di dFdU. Il volume 100 ml ha determinato un aumento di dFdC di 1.5 volte rispetto a 50 ml a pH 3.5 ma con un aumento di 20 volte della dFdU. 2 ore di instillazione hanno determinato concentrazioni di dFdC 25 volte superiori nei bracci 2 vs 5 e di 8 volte superiori nei bracci 4 vs 6 rispetto ad 1 ora mentre i livelli di dFdU sono risultati solo marginalmente aumentati.

Conclusioni: La migliore penetrazione tissutale di dFdC è stata osservata nel braccio 6, a pH 5.5 in 100 ml per 2 ore, con scarso aumento del metabolica inattivo. A pH 3.5, 50 ml per 1 ora (modalità di somministrazione più utilizzata) si sono osservati i livelli più bassi di dFdC intratumorale. La metodica descritta in questo studio potrebbe essere impiegata anche per ottimizzare i parametri di somministrazione di MMC ed Epirubicina, attualmente non ancora delucidati.

1. Introduzione

Il 70% dei carcinomi vescicali sono classificati come non muscolo-invasivi (NMIBC) e come tali

passibili di trattamento a scopo ablativo e/o profilattico con instillazioni endovesicali di agenti chemioterapici. La ricerca di molecole dotate di maggiore attività e tollerabilità ha stimolato negli ultimi anni intense ricerche miranti a valutare l'utilizzo endovesicale del chemioterapico

gemcitabina. La gemcitabina (2',2'-difluorodeossicitidina, dFdC) è un analogo della deossicitidina con un ampio spettro di attività antitumorale. Dopo essere stata trasportata nelle cellule viene fosforilata ed incorporata nel DNA e nell'RNA provocando il blocco della crescita cellulare ed innescando l'apoptosi (1). La gemcitabina viene inattivata, mediante un processo di deaminazione, nel composto 2',2'-difluorodeossiuridina (dFdU) e trasportata fuori dalla cellula. Il peso molecolare di Gemcitabina (299 D), inferiore a quello di altri agenti chemioterapici comunemente utilizzati per via endovescicale, potrebbe consentire una maggiore capacità di penetrazione della mucosa vescicale (2). Allo stesso tempo il peso molecolare è sufficientemente elevato da impedire un significativo assorbimento sistemico in una vescica intatta. Studi farmacocinetici di fase I hanno dimostrato che le concentrazioni plasmatiche sono trascurabili e transitorie per dosaggi sino a 2000 mg/50 ml (40 mg/ml) (3-6) anche quando il farmaco viene somministrato immediatamente dopo la TUR (7). Studi di fase II su lesione marker hanno evidenziato percentuali ablative variabili dal 22% (8) al 67% (9), in alcuni casi competitive rispetto a quelle ottenute in studi simili per i chemioterapici tradizionali ed il BCG (10). Il farmaco è risultato generalmente ben tollerato con aneddotiche tossicità sistemiche (3) ed effetti collaterali locali occasionalmente eccedenti il grado 2 (4).

Dall'analisi degli studi di fase I e II, gli unici attualmente disponibili, emerge però una significativa variabilità in primis della frequenza di somministrazione del ciclo di induzione settimanale [Dalbagni G et al (11) e Gunelli G et al. (12) hanno valutato uno schema bisettimanale mentre tutti gli altri autori si attengono alla modalità di somministrazione settimanale] e poi dell'utilizzo o meno di schemi di mantenimento, adottati solo da una minoranza degli autori (13).

Altresì variabile risulta poi essere la modalità con cui la molecola viene somministrata nell'ambito di ciascuna instillazione endovescicale. Variazioni del volume di diluizione [il volume standard di 50 ml rimane quello più frequente ma autori come Dalbagni G et al (3, 11) utilizzano un volume di 100 ml], del pH della soluzione [una soluzione basificata viene adottata da Dalbagni G (11) mentre Gunelli G et al. (12) e tutti gli altri somministrano la molecola a pH acido] e della durata dell'instillazione [1 ora in Mattioli F et al (14) versus 2 ore in Laufer M et al. (4) e De Berardinis E et al (6)] sono state via via adottate sulla base di criteri puramente empirici. Possono le diverse modalità di somministrazione influenzare l'efficacia terapeutica e l'assorbimento sistemico

(e quindi la tollerabilità) del farmaco? Uno studio farmacocinetico in cui si vada a testare la concentrazione intratumorale e plasmatici di gemcitabina e dei suoi metaboliti nelle diverse modalità di somministrazione della molecola potrebbe fornire una risposta a questa domanda, integrando quindi gli studi farmacocinetici iniziali (fase I) che si limitavano alla ricerca della dose massima tollerata di farmaco (3-7). Uno studio simile, di cui non esistono equivalenti anche per i tradizionali chemioterapici quali MMC ed Epirubicina, consentirebbe di dimostrare se le diverse condizioni (pH, volume di diluizione e durata della somministrazione) nelle quali è possibile somministrare gemcitabina influenzino l'accumulo tissutale di metabolita attivo (presupposto indiretto per ottimizzare l'efficacia terapeutica) e l'assorbimento sistemico.

2. Materiali e metodi

Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Ospedale S. Giovanni Battista il novembre 2006.

2.1 Criteri di inclusione

Pazienti con diagnosi cistoscopica di carcinoma vescicale di aspetto non muscolo invasivo (NMIBC), di prima diagnosi o recidivo, singolo o multifocale, di diametro compreso tra 1 e 3 cm, di età ≥ 18 anni, performance status sec. ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) ≤ 2 , normale funzione ematopoietica del midollo osseo (PTL $\geq 100.000/\text{mm}^3$, Hb ≥ 9 g/dl, neutrofili $\geq 1500/\text{mm}^3$), normale funzionalità renale (creatinina serica inferiore a 2 volte il limite superiore di normalità), normale funzionalità epatica (bilirubina, AST e ALT con valori inferiori a 2 volte il limite superiore di normalità), che hanno firmato il consenso informato, sono risultati eleggibili per lo studio.

2.2 Criteri di esclusione

Costituivano criteri di esclusione la presenza di una lesione vescicale di aspetto infiltrante, una citologia urinaria positiva per atipie di alto grado, una capacità vescicale inferiore a 150 ml od una frequenza minzionale con intervallo inferiore alle 2 ore, la presenza di un'altra neoplasia, uno stato di immunodepressione, valori di creatininemia od indici di funzione epatica superiori a 2.5 volte quelli normali, una cardiopatia NYHA di Classe II o maggiore con scompenso cardiaco congestizio, la

presenza di infezioni batteriche, virali o fungine non controllabili, la gravidanza o l'allattamento, uno stato confusionale e di disorientamento spazio temporale oppure una qualsiasi condizione medica, psicologica o sociale, che poteva pregiudicare un adeguato follow-up.

2.3 Valutazioni Basali

Le valutazioni pretrattamento comprendevano la determinazione del performance status, dei segni vitali, del peso, dell'altezza. I pazienti sono stati sottoposti ai seguenti accertamenti ematologici: emoglobina, globuli bianchi, granulociti neutrofili, piastrine, elettroliti, creatinina, bilirubina, gamma GT, AST, ALT, Rx torace, ECG esame urine + urocoltura ed esame citologico urinario.

2.4 Schema Terapeutico

Il trattamento prevedeva una somministrazione endovesicale di Gemcitabina al dosaggio standard di 2000 mg secondo diverse modalità di volume di diluizione (50 vs 100 ml), di pH della soluzione (2,5-3,5 vs 5,5) e di durata di ciascuna instillazione (1 ora vs 2 ore). Il pH di 5,5 è stato ottenuto basificando la soluzione, normalmente a pH 2,5-3,5, con bicarbonato di sodio. Era previsto l'arruolamento di 6 triplette, per un totale di **18** pazienti, suddivisi nei seguenti bracci:

braccio 1: gemcitabina 2000 mg in **50** ml (40 mg/ml) a pH **2,5-3,5** per **1 h**

braccio 2: gemcitabina 2000 mg in **100** ml (20 mg/ml) a pH **2,5-3,5** per **1h**

braccio 3: gemcitabina 2000 mg in **50** ml (40 mg/ml) a pH **5,5** per **1 h**

braccio 4: gemcitabina 2000 mg in **100** ml (20 mg/ml) a pH **5,5** per **1 h**

braccio 5: gemcitabina 2000 mg in **100** ml (20 mg/ml) a pH **2,5-3,5** per **2 h**

braccio 6: gemcitabina 2000 mg in **100** ml (20 mg/ml) a pH **5,5** per **2 h**

2.5 Acquisizione e stoccaggio dei campioni ematologici e tissutali ai fini della valutazione farmacocinetica

I prelievi ematologici sono stati effettuati al tempo 0' (prima dell'instillazione), a metà trattamento (30' per l'instillazione di 1 ora o 60' per quella di 2 ore), a fine trattamento (60' per l'instillazione di 1 ora o 120' per quella di 2 ore) e 1 ora dopo fine trattamento (120' per l'instillazione di 1 ora o 180' per quella di 2 ore). Cinque ml di sangue sono stati raccolti in una provetta eparinata cui sono stati aggiunti 40 µl di tetraidrouridina (Calbiochem, San Diego, C.A., USA), un inibitore della deossicitidina deaminasi. Il plasma è stato

separato dalla parte corpuscolata mediante centrifugazione a 1000xg per 10 minuti.

Campioni di urina sono stati raccolti rispettivamente al tempo 0' (basale) ed allo svuotamento della vescica a fine trattamento (60' per l'instillazione di 1 ora o 120' per quella di 2 ore) e stoccati in eppendorf da 1 ml. I campioni di plasma ed urina sono conservati a -80°C fino al momento dell'analisi.

Dopo un periodo compreso tra 1 e 2 ore dal termine dell'instillazione, i pazienti sono stati sottoposti, in anestesia generale, ai seguenti prelievi tissutali con pinza biotica a freddo:

- prelievo di N. 1 campione della lesione vegetante (parte esofitica)
- prelievo di N. 1 campione della "base d'impianto" dopo TUR completa della lesione
- prelievo di N. 1 campione di mucosa vescicale "macroscopicamente indenne da neoplasia" a distanza dalla lesione. I campioni sono conservati in eppendorf a - 80 °C fino al momento dell'analisi.

2.6 Estrazione dai campioni di plasma ed urina

Il metodo di estrazione utilizzato nel nostro studio si è basato sul lavoro svolto da Yilman et al (15) il quale prevede:

- aggiunta di 10 µl di standard interno a 200 µl di plasma/urina
- aggiunta di 1 ml di isopropanolo
- mescolamento attraverso vortex e riposo per 5 minuti
- aggiunta di 2,5 ml di etil acetato ed agitazione con vortex
- centrifugazione a 4 °C per 10 minuti
- essiccamento sotto flusso di azoto a 4 °C

2.7 Estrazione dai campioni di tessuto

I tre campioni tissutali (tessuto tumorale, base d'impianto, mucosa vescicale macroscopicamente indenne da neoplasia) sono stati trattati secondo quanto previsto dal lavoro di Mattioli F et al (14) cui sono state apportate alcune modifiche. Il campione da analizzare, conservato in eppendorf a -80 °C, è stato trasferito in un tubo da centrifuga in plastica e mantenuto in ghiaccio. E' stato quindi lavato per 2 minuti con 3 ml di acqua bidistillata in modo tale da portare alla lisi degli eritrociti, cui la gemcitabina si lega in modo rilevante. Eliminato il surnatante si è proceduto con un secondo lavaggio del tessuto con soluzione fisiologica (NaCl allo 0,9%) per 3 volte per 2 minuti utilizzando, ogni volta, 1 ml di soluzione. Una volta allontanato il surnatante si è quindi proceduto all'omogeneizzazione. Il tessuto è stato trasferito

in un potter da 2 cm³ a cui sono stati aggiunti 500 µl di soluzione fisiologica (passaggio effettuato anch'esso in ghiaccio). L'omogenato così ottenuto è stato trasferito in un pillolier ed il potter lavato con altri 500 µl di NaCl allo 0,9%. Il liquido di lavaggio è stato aggiunto allo stesso pillolier, in modo tale da ottenere un volume finale di 1 ml. A questo punto una parte del campione è stato sottoposto al dosaggio proteico (test di Bradford), mentre la porzione rimanente è stata utilizzata per l'estrazione e la successiva analisi. La procedura di estrazione per i campioni tissutali è risultata essere uguale a quella per i campioni plasmatici e di urina.

2.8 High Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry (HPLC-MS)

Le concentrazioni tissutali, sieriche ed urinarie di gemcitabina (dFdC) e di difluorodeossipuridina (dFdU, la forma deaminata che costituisce il metabolita inattivo) sono state determinate impiegando la metodica della High Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry (HPLC-MS), mediante utilizzo di una sorgente ESI e come fase mobile il tampone CH₃COONH₄ 0,1 mM in H₂O e CH₃OH. La Gemcitabina utilizzata nelle "stock solutions" era il GEMZAR® (Eli Lilly and Co., Indianapolis, USA); la forma inattiva deaminata della molecola (dFdU) è stata sintetizzata presso il Dipartimento di Scienza e Tecnologia del Farmaco (Prof. Cattel) mentre come standard interno è stata utilizzata la 5-fluorouridina fornita da ACROS ORGANICS, New Jersey, USA (CAS 316-46-1). Al momento dell'analisi i campioni di plasma e urina sono stati reidratati con 250 µl di ammonio acetato 0,1 mM in H₂O mentre quelli tissutali con 200 µl. Successivamente tutti i campioni sono stati vortexati e filtrati in vials da 1,5 ml nominali, tramite siringhe da insulina da 1 ml e filtri 0,45 µm GHP Acrodisc 13 mm. I campioni così ottenuti sono stati eluiti con eluizione condotta in gradiente.

2.9 Elaborazione dati

Dall'analisi degli standard, con il metodo della regressione lineare, è stata elaborata l'equazione di una retta con l'area dei picchi in funzione della concentrazione. Confrontando l'area dei picchi ottenuta dall'analisi dei campioni plasmatici dei pazienti con la curva di calibrazione, sono stati ricavati i valori delle concentrazioni incognite dei pazienti: gemcitabina ($[M]_{\square} = 262$), dFdU ($[M]_{\square} = 263$) e 5-fluorouridina ($[M]_{\square} = 261$) (16).

2.10 Valutazione della risposta

Il braccio 3 è stato eliminato dopo aver constatato l'impossibilità a mantenere in soluzione il farmaco a pH 5,5 in un volume di diluizione di 50 ml: in tali condizioni infatti la molecola precipita. L'effetto della variabile "volume di diluizione" (50 vs 100 ml) sulla biodisponibilità di Gemcitabina e dei suoi metaboliti è stato valutato al pH 2,5-3,5 confrontando i bracci 1 e 2. La variabile pH (2,5-3,5 vs 5,5) è stata invece confrontata per un'ora di instillazione tra i bracci 2 e 4 e per 2 ore di instillazione tra i bracci 5 e 6. Infine la variabile durata dell'instillazione (1 ora vs 2 ore) è stata confrontata tra i bracci 2 e 5 al pH 2,5-3,5 e tra i bracci 4 e 6 al pH 5,5.

2.11 Follow Up dei pazienti

Dopo la TUR, i pazienti sono stati seguiti in accordo con le raccomandazioni suggerite dalle Linee Guida Europee del 2007 (17): i pazienti con un NMIBC di basso grado, avendo ricevuto una instillazione "neoadiuvante" preoperatoria, non sono stati sottoposti ad altre instillazioni. I pazienti con un NMIBC a rischio intermedio hanno invece proseguito il trattamento con gemcitabina somministrata con ciclo settimanale di 6 instillazioni endovesicali. Il follow up è consistito nell'esecuzione di un esame citologico urinario ed una cistoscopia a 3, 6, 12 mesi e poi ogni 6 mesi per il 2° e 3° anno ed annualmente per i successivi 5 anni.

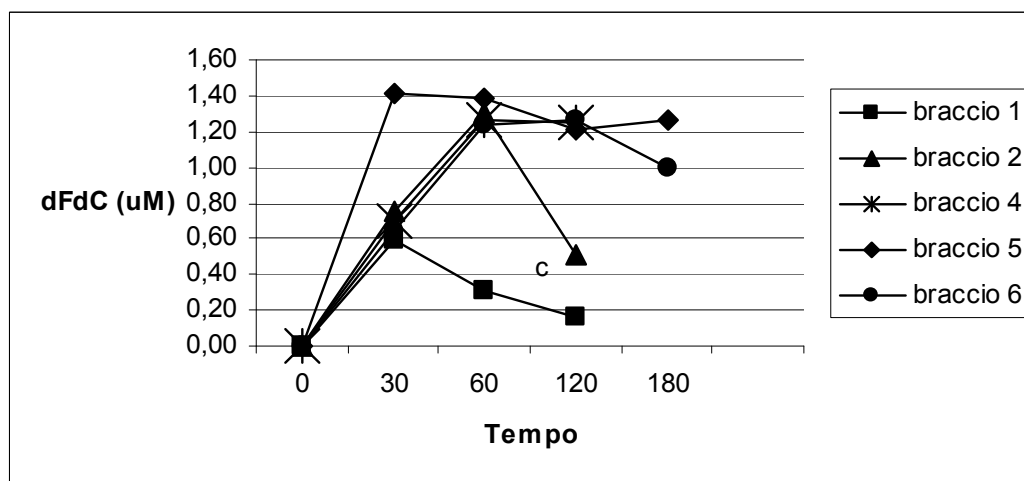
3. Risultati

Il braccio 3 in cui era previsto che 3 pazienti ricevessero 2000 mg di gemcitabina in 50 ml (40 mg/ml) a pH=5,5 per 1 ora è stato eliminato per via dell'insolubilità della molecola. Pertanto tra aprile del 2007 e maggio del 2008 sono stati arruolati 3 pazienti per ognuno dei rimanenti 5 bracci per un totale di 15 pazienti.

3.1 Stadio e grado

La figura 1 riporta le concentrazioni plasmatiche di gemcitabina nei diversi intervalli di tempo dall'instillazione intravesicale. Il livello massimo di gemcitabina ($C_{max}=1,45\mu M$) è stato raggiunto nel braccio 5 (100 ml di soluzione a pH 2,5-3,5 per 2 ore) a 30 minuti dall'instillazione. Il valore minimo ($C_{max}=0,6\mu M$) è stato invece registrato nel braccio 1 (50 ml di soluzione a pH 2,5-3,5 mantenuta per 1 ora) a 2 ore dall'instillazione.

Fig 1: Concentrazioni plasmatiche di Gemcitabina nei diversi intervalli di tempo dall'instillazione intravesicale



Le concentrazioni plasmatiche di dFdU nei vari intervalli di tempo sono riportati nella figura 2, con un picco massimo ($C_{max}=7,24\mu M$) osservato nel braccio 2, 20 mg/ml (100 ml a pH 2,5-3,5 per 1 ora) ed un valore minimo ($C_{max}=1,67\mu M$) nel braccio 4 (100 ml di soluzione a pH 5,5 per 1 ora).

3.2 Concentrazioni Urinarie

La quantità di dFdC assorbita variava dall'1% al 4% della dose totale instillata mentre la quantità di dFdU presente nelle urine non superava l'1,5%, ciò dimostrare la non presenza di deossicitidina deaminasi nelle urine (4).

3.3 Concentrazioni Tissutali

La figura 3 riporta gli istogrammi delle concentrazioni medie di dFdC nei campioni bioptici di tumore, base d'impianto e mucosa vescicale macroscopicamente sana nei diversi bracci di trattamento. Le concentrazioni più elevate

di dFdC nel tessuto tumorale (18.267,9 ng/mg di proteine) e nella mucosa sana (9.979,5 ng/mg di proteine) sono state ottenute nel braccio 6. Per la base di impianto la concentrazione massima (6.821,2 ng/mg di proteine) è stata osservata nel braccio 5. I livelli più bassi di gemcitabina sono invece stati osservati nel braccio 1, con concentrazioni di 245,6 ng/mg di proteine nel tumore, di 268,9 ng/mg di proteine nella base d'impianto e 391,9 ng/mg di proteine nella mucosa sana.

Per quel che concerne invece la dFdU, la concentrazione massima intratumorale (4.137,3 ng/mg di proteine) e nella base di impianto (1.795,9 ng/mg di proteine) è stata raggiunta nel braccio 2, mentre la concentrazione massima per il tessuto sano (1192,8 ng/mg proteine) è stata registrata nel braccio 6. Similmente ai livelli di dFdC, nel braccio 1 sono state osservate anche le minori concentrazioni di dFdU: nel tessuto malato pari a 199,5 ng/mg di proteine, nella base impianto pari a 179,6 ng/mg di proteine e nel tessuto sano

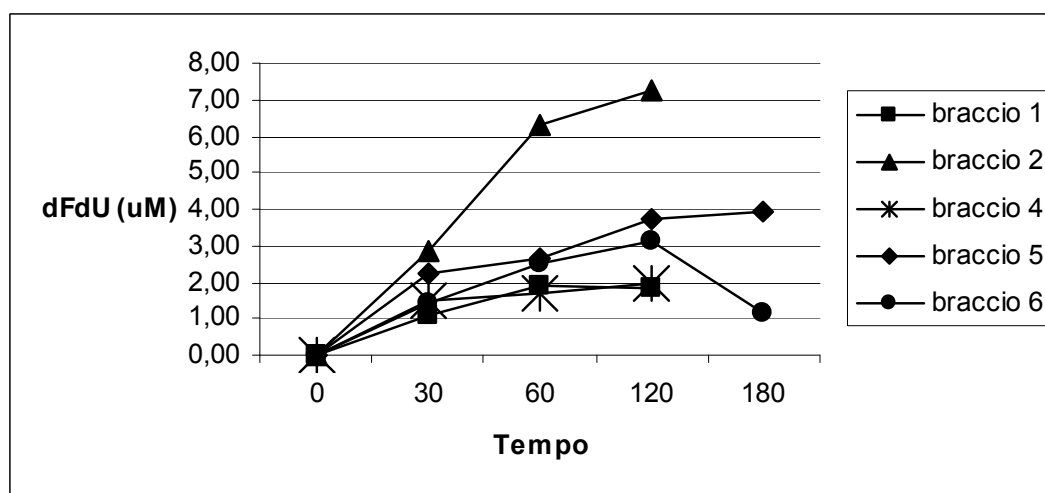


Fig 2: Concentrazioni plasmatiche di dFdU nei diversi intervalli di tempo dall'instillazione intravesicale

pari a 260,1 ng/mg di proteine (figura 4).

Fig. 3: Concentrazioni tissutali (parte esofitica, base d'impianto e mucosa macroscopicamente sana) di dFdC dopo instillazioni intravesicali di gemcitabina nei diversi bracci.

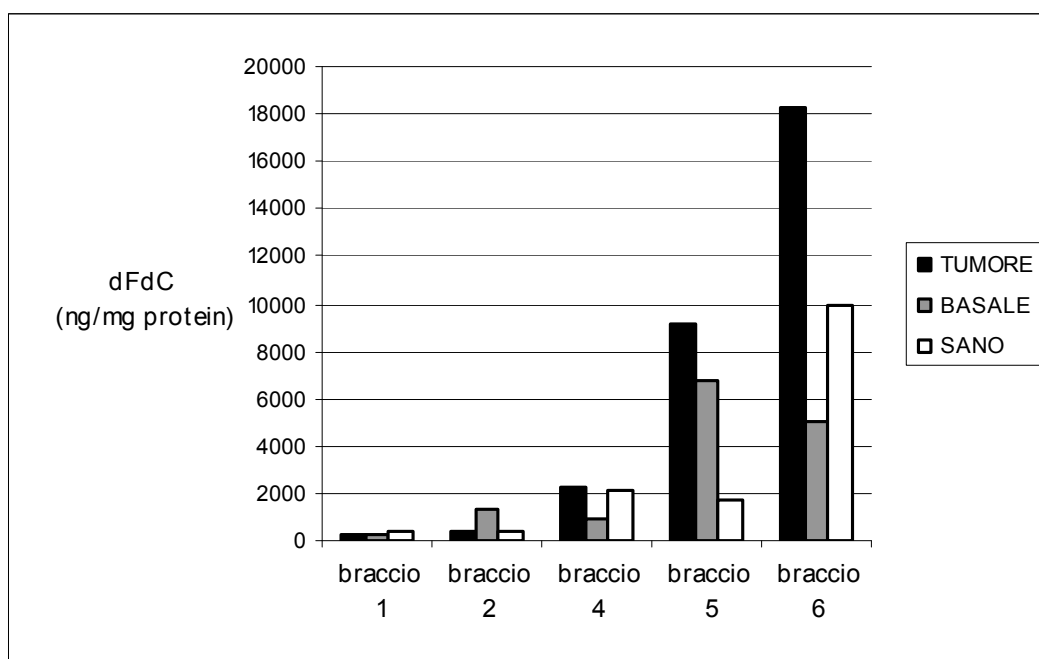
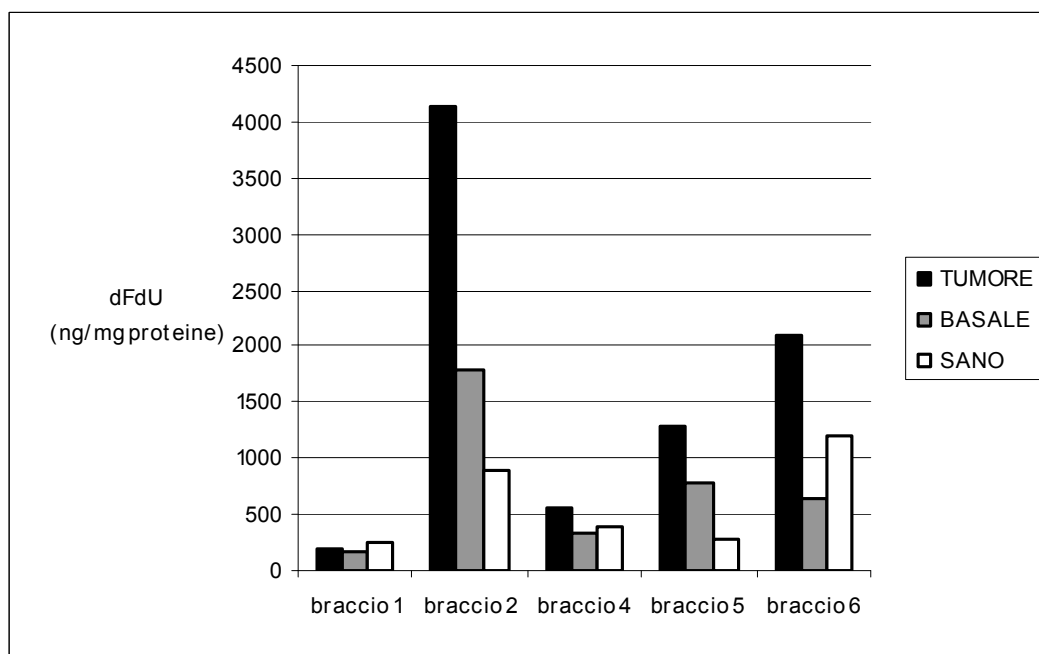


Fig. 4: Concentrazioni tissutali di dFdU dopo instillazione intravesicale di gemcitabina nei diversi bracci.



3.4 Concentrazioni tissutali e volume di diluizione

L'influenza del volume di diluizione sulle concentrazioni tissutali di dFdC e dFdU è esemplificata nella figura 5. Confrontando i bracci 1 e 2 (entrambi a pH 2,5-3,5 per la durata di 1 ora), un volume di diluizione di 100 ml ha determinato concentrazioni di dFdC maggiori in tutti i campioni tissutali. In particolare le concentrazioni intratumorali sono risultate essere di 1,5 volte superiori e quelle del tessuto sano di 1,1 volte

superiori in 100 ml rispetto a 50 ml. Una diluizione in 100 ml ha però determinato livelli di dFdU 20 volte superiori nel tessuto malato, 10 volte superiori nella base di impianto e 3,5 volte superiori nella mucosa sana rispetto alla diluizione in 50 ml.

3.5 Concentrazioni Tissutali e pH

L'influenza del pH sulle concentrazioni tissutali di dFdC e dFdU è stata valutata confrontando nei

bracci di terapia 2 e 4 una soluzione di 100 ml mantenuta in vescica per 1 ora (figura 6) e nei bracci 5 e 6 una soluzione di 100 ml mantenuta in vescica per 2 ore (figura 7).

La concentrazione di dFdU ($C_{max} = 7,24 \mu M$ vs $1,95 \mu M$) è risultata essere maggiore a pH 2,5-3,5 rispetto al pH 5,5 quando la soluzione è stata mantenuta in vescica per 1 ora (braccio 2 vs 4): in particolare nel tessuto tumorale le concentrazioni di dFdU sono risultate 8 volte superiori a pH 2,5-3,5 rispetto al pH 5,5. Al contrario, l'assorbimento di dFdC è risultato invece essere 6,2 volte maggiore nel tessuto tumorale, 5 volte superiore

nella mucosa sana ed 1,6 volte superiore nella base di impianto ($1384,8$ vs $873,4$ ng/mg proteine) a pH 5,5 rispetto al pH 2,5-3,5.

Quando la soluzione di 100 ml è stata mantenuta a contatto della vescica per 2 ore, un pH di 5,5 ha consentito il raggiungimento di concentrazioni intratumorali doppie ed in mucosa sana di 5,6 volte superiori rispetto al pH 2,5-3,5. In entrambi questi bracci le concentrazioni intratissutali di dFdU sono risultate molto basse, e solo marginalmente più elevate a pH 5,5, in 50 ml.

Fig. 5: Concentrazioni tissutali di dFdC e dFdU in relazione al volume di diluizione di gemcitabina (50 vs 100 ml): confronto del braccio di trattamento 1 con il braccio 2.

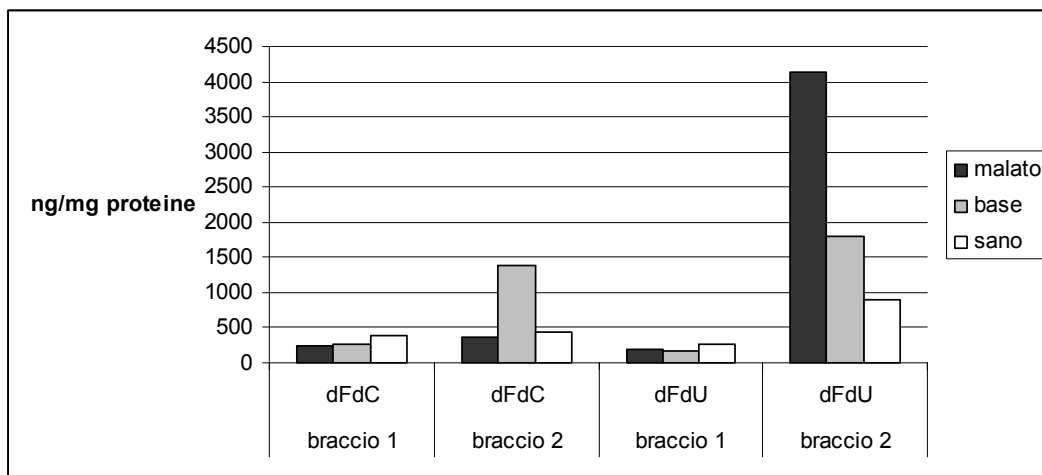


Fig. 6: Concentrazioni tissutali di dFdC e dFdU in relazione al pH della gemcitabina: nel braccio 2 (pH 2,5-3,5) e braccio 4 (pH 5,5) vengono confrontate 2 soluzioni in 100 ml mantenute in vescica per 1 ore.

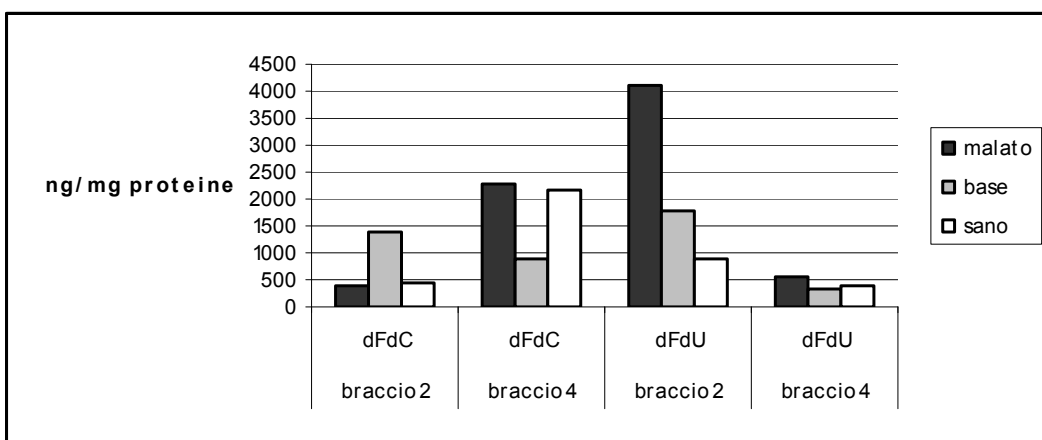
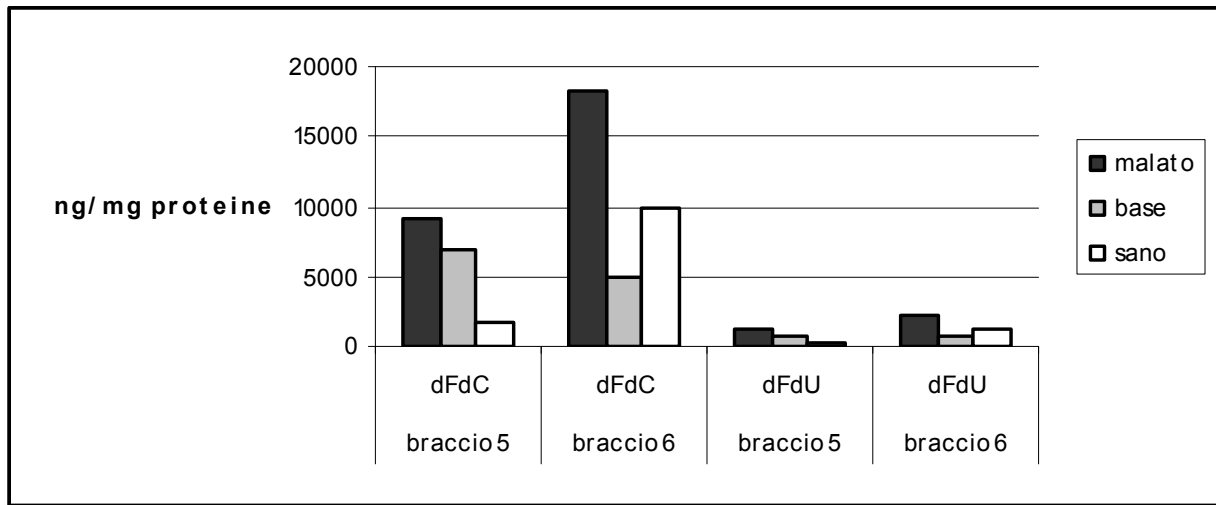


Fig. 7: Concentrazioni tissutali di dFdC e dFdU in relazione al pH: nel braccio 5 (pH 2,5-3,5) e braccio 6 (pH 5,5) vengono confrontate 2 soluzioni in 100 ml mantenute in vescica per 2 ore.



3.6 Concentrazioni Tissutali e durata dell'Instillazione

L'effetto della durata dell'instillazione (1 ora vs 2 ore) sulle concentrazioni tissutali di dFdC e dFdU è stato valutato confrontando i bracci 2 e 5 (soluzione di 100 ml a pH=2,5-3,5) (figura 8) ed i bracci 4 e 6 (soluzione di 100 ml a pH=5,5) (figura 9).

A pH 2,5-3,5 un tempo di permanenza endovesicale del farmaco per 2 ore ha determinato concentrazioni di dFdC intratumorali, della base d'impianto e della mucosa vescicale sana rispettivamente 24, 5 e 4 volte superiori rispetto ad un tempo di permanenza endovesicale di 1 ora. Al contrario, le concentrazioni di dFdU intratumorali, della base d'impianto e della mucosa

vescicale sana sono risultate essere rispettivamente 3, 2 e 3,2 volte inferiori quando il tempo di permanenza endovesicale è stato di 2 ore rispetto ad 1 ora (Figura 8).

Con una soluzione a pH 5,5 le concentrazioni di dFdC intratumorali, della base d'impianto e della mucosa vescicale sana sono risultate essere rispettivamente 7, 6 e 4,5 volte superiori dopo 2 ore di instillazione rispetto ad un'ora. Le concentrazioni di dFdU si sono incrementate di 3,7 volte, 2 volte e 3,2 volte rispettivamente nel tessuto tumorale, nella base d'impianto e nella mucosa sana con 2 ore di instillazione rispetto ad 1 ora, attestandosi però su livelli bassi in entrambe le condizioni, sia con 1 che con 2 ore di instillazione (Figura 9).

Fig. 8: Concentrazioni tissutali di dFdC e dFdU in relazione alla durata dell'instillazione endovesicale: nel braccio 2 (1 ora) e 5 (2 ore) vengono confrontate 2 soluzioni a pH 2,5-3,5 diluite in 100 ml.

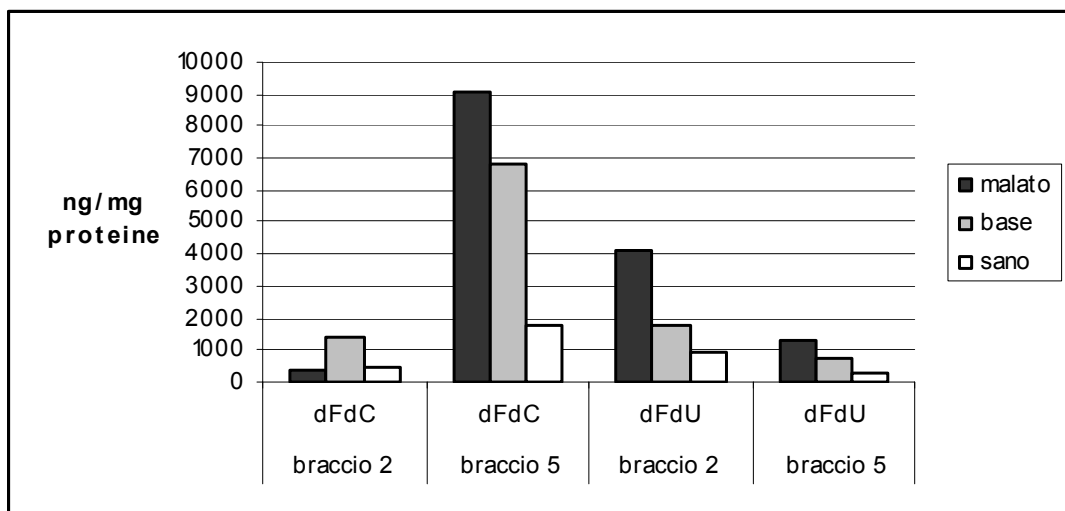
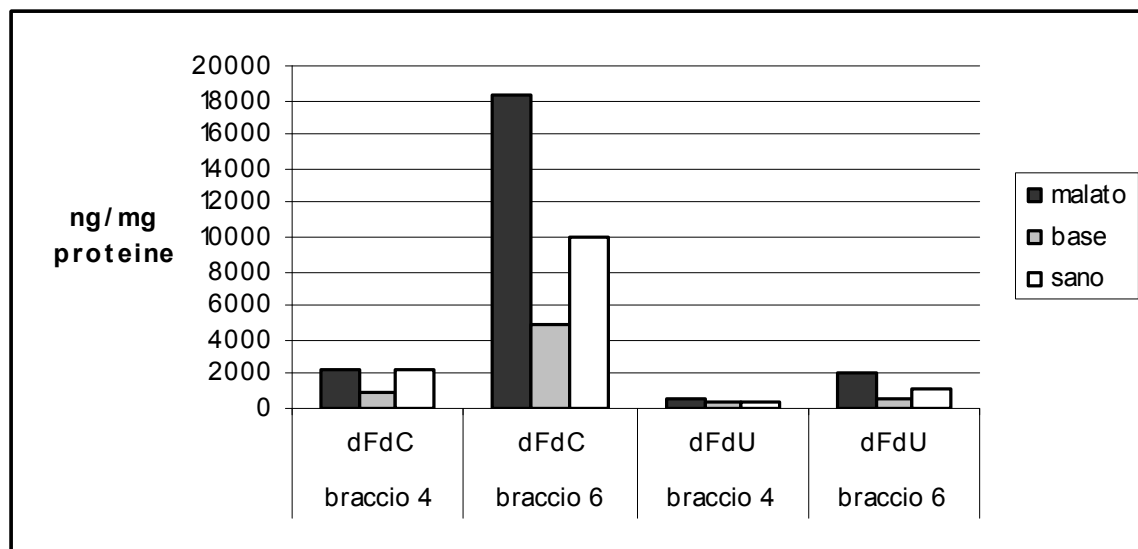


Fig. 9: Concentrazioni tissutali di dFdC e dFdU in relazione alla durata dell'instillazione endovesicale: nei bracci 4 (1 ora) e 6 (2 ore) vengono confrontate 2 soluzioni a pH 5,5 diluite in 100 ml



4. Discussione

Numerosi studi di fase I e II hanno dimostrato che la gemcitabina (dFdC) somministrata per via endovesicale alla dose ottimale di 2000 mg possiede un'attività di interesse clinico nei confronti dei NMIBC (3-7, 9, 12, 13). Tuttavia svariate modalità di somministrazione sono state via via riportate in diversi studi: variazioni del volume di diluizione del farmaco (50 ml o 100 ml), del pH della soluzione (2,5-3,5 o 5,5) e della durata del tempo di esposizione della vescica al farmaco (1 o 2 ore) vengono suggerite dai diversi autori senza alcun razionale farmacocinetico a supporto. La mancanza di sufficienti evidenze farmacocinetiche non è in realtà una caratteristica unica della gemcitabina, ma accomuna anche chemioterapici in uso da molti anni quali l'epirubicina e la mitomicina, dove la definizione di parametri essenziali quali il dosaggio ed il pH della somministrazione è tuttora basata più su criteri empirici che su evidenze cliniche (18). È ipotizzabile che la somministrazione di un chemioterapico endovesicale secondo criteri difformi di pH, volume di diluizione e durata del tempo di instillazione possa potenzialmente condizionare non solo un diverso assorbimento sistemico della molecola (incidendo quindi sulla tollerabilità del farmaco) ma anche tradursi in differenze sostanziali nella biodisponibilità intracellulare della molecola stessa e dei suoi metaboliti.

Nella presente ricerca viene proposto un modello che riteniamo innovativo per la conduzione di uno studio farmacocinetico, in quanto sono state valutate non solo le concentrazioni plasmatiche ed

urinarie della molecola gemcitabina e dei suoi metaboliti ma anche quelle presenti in campioni vescicali ottenuti mediante biopsia in vivo dopo esposizione al farmaco. Ciò è stato reso possibile grazie all'impiego della High Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry (HPLC-MS), una tecnologia che consente di misurare concentrazioni di Gemcitabina dell'ordine di 5 ng/ml rispetto all'HPLC-UV il cui limite inferiore è di 50 ng/ml. Si è reso necessario l'utilizzo di questa tecnica dal momento che studi precedenti hanno riscontrato valori di C_{max} e di AUC, anche somministrando dosaggi elevati di gemcitabina, prossimi se non sotto la soglia misurabile con i normali metodi HPLC-UV (4, 14). Confrontando le 2 tecniche nel nostro laboratorio, l'HPLC-UV si è però dimostrato essere un metodo con bassa sensibilità, confermando quanto già indicato nei lavori riportati in letteratura; l'analisi del primo paziente non ci ha infatti permesso di ottenere dei dati affidabili, in quanto i picchi relativi agli analiti sono molto piccoli e difficilmente quantificabili. La sensibilità di questo metodo analitico è di 50 ng/ml e non è sufficiente per le analisi che il nostro studio si proponeva. Uno studio precedente si era limitato a determinare le concentrazioni tissutali degli enzimi deossicitidina deaminasi (enzima inattivante) e di deossicitidina cinasi (enzima che trasforma dFdC in dFdCTP, la forma attiva della molecola) dopo instillazioni di gemcitabina nel tentativo di correlare la risposta clinica con i livelli enzimatici (6). Nei 5 gruppi di triplette di pazienti arruolati in questo studio, il farmaco è stato somministrato secondo tutte le combinazioni di pH, volume di diluizione e tempo di esposizione che si ritrovano variamente descritte in letteratura. Non è stata invece presa in considerazione la

somministrazione della molecola a pH 5,5 in 50 ml, resa poco praticabile dalla scarsa solubilità del farmaco in queste condizioni.

Il razionale di effettuare prelievi biotici a livello della porzione vegetante della neoplasia, della sua base d'impianto e della mucosa vescicale macroscopicamente sana deriva dall'esigenza di verificare se la molecola dFdC soddisfa gli obiettivi terapeutici di un chemioterapico somministrato per via endovesicale. Affinchè si attui un'efficace "chemioprolifassi" delle recidive di un NMIBC si ritiene cruciale che un farmaco endovesicale eserciti un effetto ablativo nei confronti di lesioni neoplastiche residue passate inosservate al momento della TUR e nel contempo possa "curare" un urotelio macroscopicamente indenne da malattia ma che studi molecolari hanno dimostrato contenere alterazioni geniche preneoplastiche (19). Perché si verifichino entrambe queste situazioni il farmaco deve possedere una buona "penetrabilità" non solo a livello del tumore ma anche della mucosa vescicale "macroscopicamente" indenne da neoplasia. La capacità di diffusione in profondità della molecola potrebbe invece condizionare l'efficacia terapeutica nei confronti di NMIBC che invadano la lamina propria (stadio T1). E' stata quindi inserita una biopsia della base d'impianto con l'obiettivo di verificare l'ipotesi che la gemcitabina, grazie al suo peso molecolare di 299 D, sia in grado di concentrarsi anche in profondità nella parete vescicale (20). Nessuna delle diverse modalità di somministrazione di gemcitabina ha dato luogo ad effetti collaterali diversi da quelli normalmente osservati dopo una TUR e tutti i pazienti hanno portato a termine il trattamento. I picchi di concentrazione plasmatici di dFdC nei diversi intervalli di tempo considerati sono risultati essere sovrapponibili in tutti i bracci con la sola eccezione della somministrazione a pH 3.5 in 50 ml per 1 ora (braccio 1) dove si sono registrati i più bassi livelli plasmatici. I livelli di assorbimento sistemico di dFdC nelle diverse condizioni di pH, volume di diluizione e tempo di esposizione sono comunque risultati in tutti i clinicamente irrilevanti, in linea con quanto già riportato negli iniziali studi di fase I (3-6). Anche le maggiori concentrazioni plasmatiche di dFdU rispetto a dFdC confermano il dato già emerso da studi precedenti. Al contrario, le diverse condizioni di somministrazione hanno determinato variazioni importanti nei livelli tissutali non solo del farmaco dFdC ma anche della forma inattiva dFdU. Quest'ultima osservazione indurrebbe ad ipotizzare che le diverse condizioni di acidità della molecola, il tempo di esposizione ed il volume di diluizione possano interferire in modo significativo anche con il metabolismo di gemcitabina (2, 21). La modalità

di somministrazione in cui si sono registrate le più alte concentrazioni tissutali di dFdC è risultata essere quella attuata nel braccio 6, in cui 2000 mg di gemcitabina diluiti in 100 ml a pH 5,5 sono stati mantenuti in vescica per 2 ore. In tali condizioni le concentrazioni di farmaco nella porzione esofitica del tumore, nella base d'impianto e nella mucosa sana sono risultate essere rispettivamente di 45, 25 e 12 volte superiori rispetto a quelle ottenute con la somministrazione del farmaco con una soluzione non basificata (pH 2,5-3,5) in 50 ml mantenuto in vescica per 1 ora (braccio 1). Quest'ultima rappresenta la modalità di somministrazione di gran lunga più utilizzata in letteratura per la gemcitabina (5, 8, 9, 22, 23). Come facilmente intuibile, la maggiore biodisponibilità del farmaco a livello tissutale ha condizionato livelli più elevati anche della forma inattiva della molecola. La conversione di dFdC in dFdU ad opera dell'enzima deaminasi, normalmente riscontrabile a livello intracellulare in vescica (2), è risultata essere però proporzionalmente di gran lunga inferiore, con aumenti di 10, 3 e 4 volte superiori nel braccio 6 rispetto al braccio 1.

Il confronto delle diverse triplete di pazienti ha consentito di valutare separatamente il contributo di ciascun parametro (volume di diluizione, pH e durata dell'instillazione) nel favorire le concentrazioni tissutali di dFdC e dFdU.

Un volume di diluizione di 100 ml è stato adottato da Gardmark T et al (23) e da Dalbagni G (3, 11), in quest'ultimo come scelta di necessità per permettere una completa solubilità della molecola che al pH di 5,5-7 risulta difficile in un volume di 50 ml. Nello studio in oggetto l'influenza del volume di diluizione del farmaco sulle concentrazioni intratissutali risulta marginale per dFdC ma sembra essere più spiccato per dFdU. Mentre si può facilmente intuire il vantaggio di un maggior volume di diluizione sulla diffusione intracellulare della molecola verosimilmente dovuto al fatto che la concentrazione pari a 20mg/ml è molto vicina ai limiti di solubilità della gemcitabina rispetto ad una concentrazione di 40 mg/ml, risulta meno chiaro l'aumento spiccato del metabolita inattivo.

Dalbagni G (3, 11) è l'unico autore a proporre la somministrazione di una soluzione di gemcitabina basificata al fine di ridurre il rischio di cistite chimica favorito dalla notevole acidità della molecola quando viene diluita in soluzione fisiologica. In realtà lo studio in oggetto dimostra come la somministrazione di una soluzione meno acida favorisca in modo marcato l'accumulo intratissutale del farmaco. Questo è giustificato dal fatto che la gemcitabina, somministrata sotto forma di cloridrato, dotata di un pKa di 3,6, a pH 5,5 si trova interamente nella forma indissociata (2) che è

in grado di diffondere con maggiore facilità nei tessuti. Viceversa a pH 2,5-3,5 solo il 50% della molecola si trova nella forma indissociata.

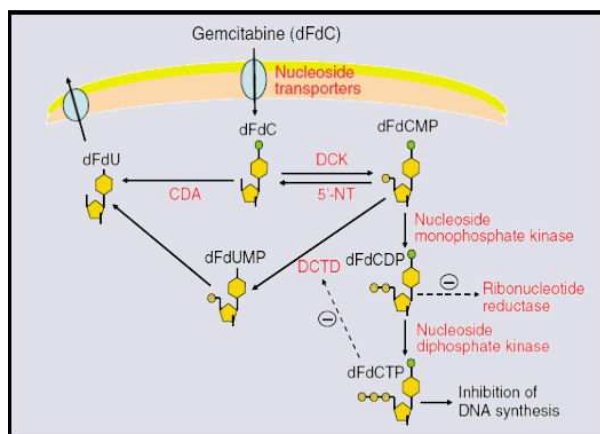
Le instillazioni endovesicali hanno una durata standard di 1 ora. Tale intervallo temporale rappresenta quasi una convenzione dettata dal fatto che intervalli più lunghi possono ridurre la tollerabilità farmacologica soprattutto in pazienti con vesciche rese ipersensibili dai cicli terapeutici. Una somministrazione di Gemcitabina al dosaggio di 2000 mg per 2 ore è stata attuata da De Berardinis E et al. (6) con buona tollerabilità ed un assorbimento sistemico insignificante. I risultati dello studio in oggetto mostrano come dopo un'instillazione della durata di 2 ore le concentrazioni tissutali di gemcitabina siano significativamente superiori rispetto a quelle ottenute con un'instillazione di una sola ora.

Oltremodo interessante appare l'osservazione secondo cui ai marcati aumenti intratissutali di dFdC non si associano equivalenti aumenti della forma inattiva dFdU. Il fenomeno, più evidente dopo alcalinizzazione della soluzione, farebbe ipotizzare che il pH in primis ma anche il tempo di esposizione ed il volume di diluizione influiscano in qualche modo sulla formazione di dFdU probabilmente attraverso l'inibizione dell'enzima DCTD (24). E' noto da studi farmacologici che tale evenienza si verificherebbe quando le concentrazioni di difluorodeossicitidinammonofosfato (dFdCMP) (25), metabolita fondamentale nel meccanismo d'azione della gemcitabina e per la formazione della forma trifosfato (molecola attiva della gemcitabina), sono talmente elevate da promuoverne l'inibizione. Si potrebbe quindi anche ipotizzare che in qualche modo un maggiore volume di diluizione del farmaco, un pH più elevato ed un maggiore tempo di contatto del farmaco con il tessuto possano inibire l'enzima DCTD semplicemente spostando i processi di metabolizzazione verso la forma trifosfato piuttosto che la forma deaminata (inattiva). La figura 10 esemplifica i processi metabolici cui va incontro gemcitabina all'interno della cellula.

5. Conclusioni

PH, volume di diluizione e tempo di contatto con la mucosa vescicale sono variabili in grado di influenzare in modo marcato le concentrazioni tissutali di gemcitabina e del suo metabolita inattivo senza favorire assorbimenti sistemici di rilevanza clinica. Una somministrazione di 2000 mg di gemcitabina a pH 5,5 in 100 ml mantenuta in vescica per 2 ore consente il raggiungimento di concentrazioni intratissutali di farmaco attivo

decine di volte superiori rispetto alla somministrazione standard a pH acido, in 50 ml con un tempo di esposizione di 1 ora. Elevati pH, volume di diluizione e tempo di instillazione sembrano invece inibire la conversione di gemcitabina nella forma inattiva. Si suggerisce pertanto l'adozione di questa modalità di somministrazione nei futuri studi clinici che dovranno dimostrare se queste vantaggiose condizioni farmacocinetiche si traducano in una maggiore attività antitumorale. Infine questo modello sperimentale potrebbe trovare applicazione anche nello studio di altri chemioterapici endovesicali al fine di ottimizzarne la modalità di somministrazione.



Bibliografia

- [1] Bergman AM, Pinedo HM, Peters GJ. Determinants of resistance to 2',2' difluorodeoxycytidine (gemcitabine). *Drug Resist Updat* 2002; 5 (1): 19-33.
- [2] Plunkett W, Huang P, Zheng Y. Gemcitabine: metabolism, mechanisms of action, and self-potentiation. *Semin Oncol* 1995; 22 (Suppl 11): 3-10.
- [3] Dalbagni G, Russo P, Sheinfeld J et al. Phase I trial of intravesical gemcitabine in bacillus Calmette-Guerin-refractory transitional-cell carcinoma of the bladder. *J Clin Oncol* 2002; 20 (15): 3193-8.
- [4] Laufer M, Ramalingam S, Schoenberg MP et al. Intravesical gemcitabine therapy for superficial transitional cell carcinoma of the bladder: a phase I and pharmacokinetic study. *J Clin Oncol*. 2003; 21 (4): 697-703.
- [5] Witjes JA, van der Heijden AG, Vriesema JL et al. Intravesical gemcitabine: a phase I and pharmacokinetic study. *Eur Urol* 2004; 45 (2): 182-6.

- [6] De Berardinis E, Antonini G, Peters GJ et al. Intravesical administration of gemcitabine in superficial bladder cancer: a phase I study with pharmacodynamic evaluation. *BJU Int* 2004; 93 (4): 491-4.
- [7] Palou J, Carcas A, Segarra J et al. Phase I pharmacokinetic study of a single intravesical instillation of gemcitabine administered immediately after transurethral resection plus multiple random biopsies in patients with superficial bladder cancer. *J Urol* 2004; 172 (2): 485-8.
- [8] Serretta V, Galuffo A, Pavone C, Allegro R, Pavone-Macaluso M. Gemcitabine in intravesical treatment of Ta-T1 transitional cell carcinoma of the bladder: phase I-II study on marker lesion. *Urology* 2005; 65 (1): 65-69.
- [9] Calais da Silva FM, Calais da Silva FE. Phase 2 study 2000 mg of intravesical gemcitabine. *Eur Urol* 2005; 4 (Suppl 3): 877.
- [10] Mack D, Holtl W, Bassi P et al. The ablative effect of quarter dose BCG on a papillary lesion of the bladder. *J Urol* 2001; 165: 401-403.
- [11] Dalbagni G, Russo P, Bochner B et al. Phase II trial of intravesical gemcitabine in bacilli Calmette-Guerin-refractory transitional cell carcinoma of the bladder. *J Clin Oncol*. 2006 Jun 20;24(18):2729-34.
- [12] Gunelli R, Bercovich E, Nanni O, Ballardini M, Frassinetti GL, Giovannini N, Fiori M, Pasquini E, Ulivi P, Pappagallo GL, Silvestrini R, Zoli W. Activity of endovesical gemcitabine in BCG-refractory bladder cancer patients: a translational study. *Br J Cancer*. 2007 Dec 3;97(11):1499-504.
- [13] Bartoletti R, Cai T, Gacci M et al. Intravesical gemcitabine therapy for superficial transitional cell carcinoma: results of a Phase II prospective multicenter study. *Urology*. 2005 Oct;66(4):726-31.
- [14] Mattioli F, Curotto A, Manfredi V et al. Intravesical gemcitabine in superficial bladder cancer: a phase II safety, efficacy and pharmacokinetic study. *Anticancer Res* 2005; 25: 2493-2496.
- [15] Bilal Yilmaz, Yucel Kadioglu, Yilmaz Aksoy *Analytic Biochemistry* 2004; 332: 234-237.
- [16] Xu Y, Keith B, Grem JL. Measurement of the anticancer agent gemcitabine and its deaminated metabolite at low concentrations in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004;5;802(2):263-70.
- [17] Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R ET AL. EAU Guidelines on Non-Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder. *Eur Urol* 2008;54(2):303-14.
- [18] Harris NM, Duffy PM, Crook TJ, Anderson WR, Sharpe P, Hayes MC, Cooper AJ, Solomon LZ. Intravesical pH: a potentially important variable affecting efficacy and the further development of anthracycline chemotherapy for superficial bladder cancer. *BJU Int* 2002;90(9):957-64.
- [19] Grossman HB, Schmitz-Dräger B, Fradet Y, Tribukait B. Use of markers in defining urothelial premalignant and malignant conditions. *Scand J Urol Nephrol Suppl*. 2000;(205):94-104.
- [20] Odonnel MA, Evanoff D, Luo Y. Studies on Gemcitabine as an intravesical agent for superficial bladder cancer. *J Urol* 2003; Suppl 4: 508.
- [21] Storniolo AM, Allerheiligen SRB, Pearce HL: Preclinical, Pharmacologic and Phase I Studies of Gemcitabine. *Semin Oncol* 1997, 24 (2 Suppl 7): S7-2-S7-7
- [22] Gontero P, Casetta G, Maso G, Sogni F, Pretti G, Zitella A, Frea B, Tizzani A. Phase II study to investigate the ablative efficacy of intravesical administration of gemcitabine in intermediate-risk superficial bladder cancer (SBC). *Eur Urol* 2004 Sep;46(3):339-43.
- [23] Gårdmark T, Carringer M, Beckman E, Malmström PU; Members of the Intravesical Gemcitabine Study Group. Randomized phase II marker lesion study evaluating effect of scheduling on response to intravesical gemcitabine in recurrent Stage Ta urothelial cell carcinoma of the bladder. *Urology* 2005;66(3):527-30
- [24] Ueno1, K Kiyosawa2 and N Kaniwa3 Pharmacogenomics of gemcitabine: can genetic studies lead to tailor-made therapy? *Journal of Cancer* 2007; 97: 145–151.
- [25] Mini E, Nobili S, Caciagli B, Landini I, Mazzei T. Cellular Pharmacology of Gemcitabine. *Annals of Oncology* 17 2006; (Supplement 5): v7-v12.